

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Fluoreszenzzytometrische Untersuchungen
über altersabhängige Änderungen der Farbstoffbindungskapazität
des Nucleoproteidkomplexes von Mäuse-Leberzellkernen
nach Hydrocortisonacetatstimulierung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
EVA VÖLKER geb. MICHELSEN
aus Oslo

Mainz 1975

Aus dem Pathologisch-Anatomischen Institut
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Fluoreszenzzytometrische Untersuchungen
über altersabhängige Änderungen der Farbstoffbindungskapazität
des Nucleoproteidkomplexes von Mäuse-Leberzellkernen
nach Hydrocortisonacetatstimulierung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
EVA VÖLKER geb. MICHELSEN
aus Oslo

Mainz 1975



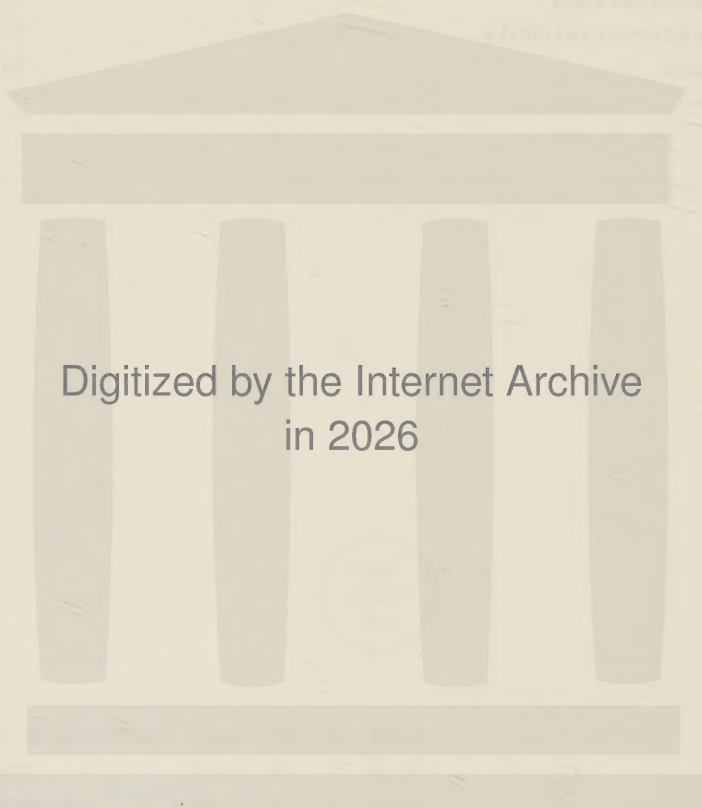
Fachbereichsdekan: Prof. Dr. R. Wolf

Referent: Prof. Dr. H. Bredt

Korreferent: Prof. Dr. J. Lühr

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methode	4
C. Ergebnisse	12
D. Diskussion	33
E. Zusammenfassung	41
F. Literaturverzeichnis	42
Lebenslauf	52



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554413_0115

A . E I N L E I T U N G

Die Alternsforschung hat sich in den letzten zehn Jahren mit besonderem Interesse und steigender Intensität Veränderungen nukleärer Funktionsstrukturen auf molekularer Ebene zugewendet, um so das Phänomen des physiologischen Alterns und der pathologischen Alterung besser erfassen zu können. Diese Arbeiten führten zu einer Reihe unterschiedlichster Hypothesen.

So sollen physiologische Alternsprozesse möglicherweise auf dem Niveau der Makromoleküle des Zellkernes ablaufen (VERZAR 1963; v. HAHN 1970 a, b), wobei somatische Mutation und chromosomale Aberration wohl nur eine untergeordnete Rolle spielen (SINEX 1966).

Andererseits wird eine im Alter zunehmende permanente Repression genetischer Information auf der DNA-Matrize mit der Folge eines relativen Verlustes an genetischer Information für elementare Zellstoffwechselprozesse diskutiert. Es resultiert der Zelltod (HARBERS und SANDRITTER 1968). Für diese Theorie spricht die mit steigendem Alter zu beobachtende Abnahme der Adaptations- und Regenerationsfähigkeit der normalen, differenzierten, somatischen Zelle an exogene und endogene Belastungen (COMFORT 1968; v. HAHN 1971). Damit wird die Erhaltung der Homöostase, des "inneren Milieus", mit zunehmendem Alter immer schwieriger als Konsequenz eingeschränkter Funktionen intrazellulärer Regulationsmechanismen (COMFORT 1968). In der Folge kommt es wahrscheinlich zu einer verminderten RNA-Biosyntheserate und Reduktion der Proteinbiosynthese bei gewahrter DNA-Konstanz (ENESCO 1967; PAULINI et al. 1971).

Die Ursache dieser altersabhängigen Funktionseinschränkungen der Zelle wurde in zahlreichen Experimenten untersucht. Sie bestätigten diese Zellfunktionsstörungen als Folge vermutlich irreversibler Beeinträchtigungen im Transkriptions- und Translationsprozeß auf dem Boden physikalischer und biochemischer Ver-

änderungen am Desoxyribonukleoprotein(DNP)-Komplex (MEDVEDEV 1964, 1966; COMFORT 1968; v. HAHN 1970; LÖHR 1972).

Das Verdienst dieser Erkenntnisse kommt in erster Linie VERZAR (1962) und v. HAHN (1963 a, b, 1964/65 a, b, 1965, 1966 a,b, 1971) zu. VERZAR hat die Hypothese entwickelt, daß das zelluläre Altern mit einer Versteifung des gesamten DNP-Komplexes durch Ausbildung von Quervernetzungen ("cross-links") entweder zwischen den DNA-Strängen oder den DNA-Molekülen und den basischen nukleären Eiweißkörpern einhergeht. v. HAHN ergänzte dahingehend, daß elektrostatische Bindungen zwischen DNA-Molekülen und nukleären Proteinen, z. B. Histone, oder innerhalb der Watson-Crick-Spirale im Alter "stabilisiert" werden. Die Folge könnte eine qualitative Änderung der nukleären Chromatinfractionen im Sinne einer Heterochromatisierung sein. Diese Folgerungen decken sich mit den grundlegenden Arbeiten von SANDRITTER et al. (1965), welche anhand von Feulgen-Hydrolysekurven von Leberzellkernen und Thymuslymphozyten die Funktionsstrukturen des Zellkernes, insbesondere die verschiedenen Chromatinfractionen, hinsichtlich ihrer Struktur, ihres physikochemischen Verhaltens und ihrer Funktionen im Rahmen des Zellstoffwechsels identifizierten. Gleichzeitig zeigen sich nach den Beobachtungen von HUANG und BONNER (1963) sowie HARBERS und SANDRITTER (1968) strukturelle Unterschiede der beiden wichtigsten Chromatinfractionen in Bezug auf das Verhältnis von S-S- zu S-H-Gruppen, ihrer Dichte sowie ihrem Gehalt an freien Phosphationen und diversen Eiweißkörpern.

Auch bei der Heterochromatisierung werden wahrscheinlich "genetisch aktive" Loci auf den DNA-Strängen irreversibel blockiert, was eine permanente Repression genetischer Information (HARBERS und SANDRITTER 1968; SANDRITTER 1970; BENEKE et al. 1971) mit der Folge des Verlustes der Regenerationsfähigkeit der Zelle bedeuten könnte. Einen ähnlichen Effekt hat vermutlich auch die im Alter in zahlreichen Organen außerdem auftretende Polyploidisierung der Zellkerne (BENEKE et al. 1971; LÖHR und HIMMELSBACH 1972).

Die Untersuchungen von HUANG und BONNER (1962) sowie von FRENSTER (1965 a, b, c) deuten darauf hin, daß gerade die Phosphatgruppen der DNA für die Transkription genetischer Information von entscheidender Bedeutung sind. Sie dienen wahrscheinlich den sogenannten argininreichen Histonen, die als genetisch besonders aktive Repressoren mit hoher Affinität zur DNA bekannt sind, als Haftpunkte (HUANG und BONNER 1962). Die Anzahl der sterisch "freien" PO_4^{--} -Gruppen erlaubt vermutlich eine Aussage über den aktuellen Repressionsgrad des DNP-Komplexes (RIGLER 1966).

Anhand bestimmter zytochemischer Reaktionen an Chromatin-Bausteinen konnte die Alternshypothese von v. HAHN durch ausführliche Untersuchungen am Leberzellkern bestätigt werden (LÖHR 1972).

So konnte an verschiedenen Tierspecies aufgrund der Änderungen der Farbstoffbindungskapazität des Desoxyribonukleoprotein-Komplexes (DNP) junger und alter Tiere die altersbedingte Zunahme der Vernetzung innerhalb der Chromatinstrukturen mit verminderter Reagibilität des Leberzellkern-DNP-Komplexes demonstriert werden (LÖHR 1972). Die hier angesprochene Abnahme der Farbstoffbindungskapazität des DNP für Acridinorange im Alter erlaubt die Annahme einer altersabhängigen Veränderung des Repressionsgrades im Zellkern, mit Abnahme der "freien" DNA- PO_4^{--} -Gruppen, bzw. eine zunehmende, vermutlich permanente Repression genetischer Information auf der DNA-Doppelhelix.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Antwortbereitschaft des Genoms junger und alter Mäuse auf Stimulierung mit Hydrocortisonacetat geprüft werden. Als hepatotropes Hormon wurde Hydrocortisonacetat gewählt, von dem heute mit ziemlicher Sicherheit zu sagen ist, daß dieses Hormon direkt auf die Funktionsstrukturen des Zellkernes und in die Regulation des genetischen Informationsflusses eingreift (JERVELL 1963; DAHMUS und BONNER 1965; BEATO et al. 1968; KARLSON und SEKERIS 1973).

B . M A T E R I A L U N D T E C H N I K

1. DAS MATERIAL UND SEINE VORBEREITUNG

Untersucht wurden Leberzellkerne von insgesamt 34 männlichen Albino-Mäusen (Stamm: Pirbright-Albino) in Ausstrichpräparaten. Die Tiere gehörten drei Altersklassen an: 24 Monate, 12 Monate und 4 Monate. Sie erhielten eine Standardkost und Wasser ad libitum.

Das Kontingent der Tiere wurde in vier Gruppen eingeteilt, die jeweils aus zwei Untergruppen (Serien) bestanden. So ergab sich die Einteilung: Gruppe 1: Serie A + B / Gruppe 2: Serie C + D /
Gruppe 3: Serie E + F / Gruppe 4: Serie G + H.

Die Serien A, B, C, D, E und F bestanden jeweils aus einem Tier der drei Altersklassen, also insgesamt drei Tiere. Jede Gruppe (1 - 4) enthielt außerdem drei Kontrolltiere. In den Serien G und H waren nur zwei Alterklassen repräsentiert, da zwei Alt-tiere vorzeitig verstarben.

Die Tiere der Serien A - D erhielten eine einmalige Gabe von 25 mg Hydrocortison-Kristallsuspension (Fa. Hoechst, Frankfurt/Main. 1 ml = 0,025 g Hydrocortisonacetat, 0,009 g NaCl, 0,009 g Emulgator, 0,00945 g Benzylalkohol) pro 200 g Körpergewicht (KGW) als tief intramuskuläre Injektion. Die Hormongaben erfolgten stets zur gleichen Tageszeit. Als Kontrolltiere dienten je zwei Tiere der drei Alterklassen, die keine Injektionen bekamen. Eine einmalige Dosis von 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW wurde den Tieren der Serien E - H in gleicher Weise verabreicht.

Die Tiere wurden vier Stunden nach der Hormoninjektion durch Dekapitation getötet. Nach Ausblutung wurden die Leber entnommen, das Lebergewicht bestimmt und mit einem geschliffenen Objektträger der Abstrich der Zellen von der sagittalen Schnittfläche des linken Leberlappens genommen. Nach Zerquetschung der

abgestrichenen Zellen zwischen zwei gereinigten Objektträgern wurde ein Ausstrich mit der Kante eines Objektträgers auf einem zweiten, fluoreszenzfreien Objektträger (Fa. Kindler, Freiburg i. Br.) hergestellt. Auf diese Weise wurden pro Tier acht Ausstriche angefertigt, die nach 10 Minuten Lufttrocknung bis zur Färbung entweder in 10 %igem neutral gepuffertem Formalin bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ im Kühlschrank oder trocken über Silikagel bei $- 6^{\circ} \text{C}$ aufbewahrt wurden. Die Ausstriche für die Feulgen-Nucleal-Reaktion und die Fastgreen-Färbung wurden trocken über Silikagel bei $- 6^{\circ} \text{C}$ nach einstündiger Fixierung in 96 %igem Äthanol aufbewahrt. Die Fixierungsdauer betrug maximal 24 Stunden. Die Präparate einer Gruppe (2 Serien + Kontrolltiere) wurden in einem Arbeitsgang pro Färbung angefertigt und ausgewertet.

2. FÄRBUNGEN

Die histochemischen Färbungen erfolgten mit jeweils einem Präparat pro Tier aus den drei Altersklassen. Gefärbt wurde nach den von RIGLER (1966) für Acridinorange (AO), von MAGUN und KELLY (1969) für Phenanthrenchinon (PQ), von MÜLLER (1966) für die Feulgen-Nucleal-Reaktion und von NOESKE (1968) für die Fastgreen (FCF)-Färbung angegebenen Methoden.

a. Acridinorange-Färbung nach RIGLER (1966) (Fa. MERCK, Darmstadt, C.I. 46005, S.Nr. 902)

Aus einer Standardlösung von 1 mg/ml Aqua bidest. wurde eine für jeweils zwei Färbereien ausreichende Menge Farbstofflösung mit einer Endkonzentration von 10^{-4} M in Zitronensäure- Na_2HPO_4 -Puffer (McIlvaine-Puffer), pH 4,1, unter radiometrischer Kontrolle hergestellt.

Ausführung der Färbung:

1. 5 min. Acetylierung mit Pyridin, wasserfrei (Fa. Merck, Darmstadt, Nr. 7461)
 2. 15 min. Pyridin-Essigsäureanhydrid (Fa. Merck, Nr. 42) 3 : 2
 3. jeweils 5 min. Auswaschen des Essigsäureanhydrids und Herstellung eines wäßrigen Mediums mit Äthanol 100 %, 96 %, 60 %, 30 %
 4. 3 min. Aqua bidest.
 5. Färbung mit
 - a. 5 min. McIlvaine-Puffer pH 4,1
 - b. 15 min. McIlvaine Puffer + AO pH 4,1
 6. dreimal 5 min. Rediffusion von ungebundenem AO durch McIlvaine-Puffer pH 4,1
 7. Eindecken mit McIlvaine-Puffer pH 4,1, Deckglasgröße 24 x 150 mm, unter Belastung von zweimal 10 g
 - 8 Umrandung mit Nagellack
- b. Phenanthrenchinon-Färbung zur Darstellung der Arginin-Residuen (Fa. Schuchardt, München) nach MAGUN und KELLY (1969)

Nach Fixation in neutral gepuffertem Formalin wurden die Ausstrichpräparate eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

Ausführung der Färbung:

1. 5 min. Äthanol 70 %
2. 5 min. Äthanol 100 %
3. 5 min. Xylol
4. dreimal 1 min. Äthanol 99 %
5. 10 min. Färbung mit Phenanthrenchinon
6. dreimal 1 min. Spülen mit Äthanol 99 %
7. 5 min. Äthanol 70 %
8. 5 min. Äthanol 30 %
9. 5 min. Aqua dest.

10. Eindecken mit frisch zubereiteter Lösung aus 9 Teilen
nichtfluoreszierendem Glycerin und 2 Teilen
5 n NaOH
11. Abdichtung mit Nagellack

Für jede Färbereihe wurde die Farbstofflösung frisch hergestellt nach folgendem Muster: 200 mg Phenanthrenchinon wurden in 20 ml Dimethylformamid gelöst und kurz vor der Färbung mit einer zweiten Lösung, bestehend aus 2 ml 5 n NaOH, 18 ml Aqua dest., und 80 ml Äthanol 100 % vermischt, bis ein tief roter Farbton eintrat.

c. Feulgen-Reaktion zur DNA-Darstellung nach MÜLLER (1966)

Es wurde eine für jeweils zwei Färbereien ausreichende Menge Schiffssches Reagens (nach GRAUMANN 1953) hergestellt. Dabei wurden erst 0,5 g Pararosanilin (Base) (Fa. Merck, Darmstadt, C.I. 42500, S.Nr. 779) in 15 ml 1 n HCl ohne Erwärmen gelöst und danach eine Lösung aus 0,5 g Kaliummetabisulfit ($K_2S_2O_5$) und 85 ml Aqua dest. zugesetzt. Nach 24 Stunden wurde dieses Gemisch über Aktivkohle filtriert und im Dunkeln aufbewahrt.

Ausführung der Färbung:

1. 1 Std. Fixierung in 95 %igem Äthanol
2. 8 Std. Hydrolyse der Präparate in 1 n HCl bei 60° C (nach SANDRITTER et al., 1965, diffundieren auch niedermolekuläre Abbauprodukte und Aldehydgruppen aus dem Zellkern bei längerer Hydrolysedauer). - Im Hydrolysebad standen die Präparate von jungen und alten Tieren zufallsmäßig gemischt.
3. Schnelles Einstellen der Präparate in Schiffssches Reagens für 60 min.
4. dreimal 10 min. Waschen in folgender jeweils frisch hergestellter Spülflüssigkeit:

10 ml 1 n HCl + 12 ml 10 %ige wäßrige Kaliummetabisulfitlösung, mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen

5. jeweils 3 min. Äthanol 30 %, 60 %, 70 %, 96 %

6. 5 min. Xylol

7. Eindecken mit Eukitt, das ein Medium mit angepaßtem Brechungsindex ($n = 1,495$) darstellt

d. Fastgreen-FCF-Färbung zur Histondarstellung nach NOESKE (1968)

Nachfixierung der Ausstrichpräparate mit neutralem gepuffertem 10 %igem Formalin 1 Stunde lang. Danach Waschen der Präparate unter fließendem Leitungswasser 2 Stunden.

Ausführung der Färbung:

1. 15 min. Hydrolyse der Präparate in 5 %iger Trichloressigsäure bei 90°C

2. zweimal 10 min. Auswaschen der Säure in 70 %igem Äthanol

3. 10 min. Aqua dest. pH 8,1 (mit NaOH eingestellt)

4. 30 min. bei Raumtemperatur Färben in 0,1 %iger wäßriger Fastgreenlösung von pH 8,1 (mit NaOH eingestellt), (Fastgreen FCH, Fa. Chroma-Gesellschaft, Stuttgart)

5. dreimal 1 min. rasches Differenzieren in alkalisiertem Aqua dest. mit pH 8,1 und

zweimal 1 min. in Aqua dest. mit pH 8,5 (mit 0,1 n HCl eingestellt)

6. 1 min. Äthanol abs.

7. 1 min. Xylol

8. Eindecken mit Eukitt ($n = 1,495$)

3. MIKROFLUOROMETRISCHE MESSUNGEN

Die mikrofluorometrischen Messungen wurden mit einem Mikroskopphotometer mit variabler Meßblende vorgenommen (Fa. Leitz, Wetzlar). Aufbau im wesentlichen nach BÖHM und SPRENGER (1968):

a. Durchlicht zur Objekteinstellung:

Phasenkontrast (Kondensor nach HEINE 1931), Ölimmersionsobjektiv PvFl 70 x N.A. 1,15; Niedervoltlampe 5 V. Die Ausbleichung wurde durch Vorschaltung eines Interferenzdoppelbandfilters 618 ± 22 niedrig gehalten.

b. Messung in Auflichtfluoreszenz.

Optische Einrichtung: Ploem-Opak, Objektiv PvFl 70 x wie oben. Anregung durch Xenon-Höchstdruckbrenner XBO, 150 W (Osram, W.-Berlin), Gleichrichtervorschaltgerät Typ VX 150 f-2 b-L unter Vorschaltung eines Spannungskonstanthalters Typ EMK vX (Dominit), beide Geräte Fa. Siemens, Erlangen. Wärmeschutzfilter BG 38, ZerstreuungsfILTER NG 1, Erregerfilter UG 1, Sperrfilter für AO-Färbung 510 nm, Sperrfilter für Phenanthrenchinonfärbung 470 nm, Interferenzbandverlaufsfilter Veril a, Typ B-6 (alle Filter Fa. Schott und Gen., Mainz).

Meßeinrichtung S-20 Photokathode Typ 9558 A (Fa. EMI, England), spektrale Empfindlichkeit s. DENKHAUS und HEIMER (1970).

Spannungsteiler Typ SKV/K BN 345 A, hochstabilisiertes Netzgerät Typ NSHM BN 600 S/N 481, zusammengefaßt in der Lichtmeßeinrichtung Typ MFLK BN 5007 (Fa. Knott, München).

Saugspannung 1,4, 1,6, 1,0, 0,9 kV. Meßinstrument: Mikroampèremeter, Meßbereich 0,0018 - 20 μ A/Skalenteile (Skt) (Fa. Norma, Wien, Österreich).

Die Messungen beziehen sich in der Zytophotometrie auf ein Areal, in dieser Arbeit auf die Kerne der ausgestrichenen Zellen. Das Produkt aus mittlerer Extinktion eines solchen Areals und seiner Fläche (in μ^2) ist das Maß für den Farbstoffgehalt bzw. für die Menge der mit dem Farbstoff verbundenen

Substanz. Die Maßeinheit dieser relativen Mengenbestimmung ist die Arbeitseinheit (AE). Die Wahl der für die Messungen notwendigen Wellenlängen richtet sich nach dem Absorptionsmaximum bzw. Emissionsmaximum der bei den zytochemischen Reaktionen verwendeten Farbstoffe:

Farbreaktion	Sperrfilter	Emission
AO	510 nm	530 nm
PQ	470 nm	490 nm
Feulgen	550 nm	570 nm
Fastgreen	610 nm	630 nm

Die Extinktion E ist der dekadische Logarithmus des Quotienten von einfallendem (I_0) und hindurchtretendem Licht (I):

$$E = \log \frac{I_0}{I}$$

Meßvorgang:

1. Objekt bei der angewandten färbungsspezifischen Wellenlänge im Phasenkontrast einstellen
2. Ausblendung des Durchlichtes
3. Öffnen des Photomultipliierverschlusses, dabei Interferenzbandverlaufsfilter einstellen
4. Einblenden des UV-Lichtes
5. Ablesen des maximalen Galvanometerausschlages nach ≤ 1 sec.
6. Ausblenden des UV-Lichtes
7. Leerwert (in zellfreiem Feld) direkt neben dem Objekt in gleicher Weise, wie in Punkten 2 - 6 beschrieben, messen (bei AO- und PQ-Färbung)

Pro Präparat wurden 100 bis 180 Leberzellkerne gemessen. Als Referenzsystem dienten in den Leberausstrichen enthaltene Granulozyten und Kupffersche Sternzellen. Die Feulgen- und Fastgreen-Meßwerte der nicht teilungsfähigen Zellen entsprechen der DNA-Menge diploider Kerne (NOESKE 1968). Es wurden pro Präparat

bei diesen Färbungen 30 bis 35 Kerne gemessen. Bei der Messung war nicht bekannt, zu welcher Alters- und Dosierungsgruppe das Präparat gehörte.

4. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Berechnungen erfolgten im Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation (Mainz) mit Hilfe eines programmierten Tischrechners (Olivetti Programma 101). Es wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardabweichungen der Mittelwerte der Fluoreszenzemissionen pro Präparat und pro Gruppe berechnet.

C . E R G E B N I S S E

1. HISTOMORPHOLOGIE

Es fällt auf, daß die Form der Mäuseleberzellkerne im Alter unregelmäßiger wird. Neben ovalen Formen findet man Kerne mit gelappten und ausgebuchteten Konturen. Die vorhandenen diploiden Leberzellkerne alter Tiere erscheinen kleiner und chromatindichter als die Kerne junger Tiere. Das Kernbild junger Individuen ist eher monomorph. In den untersuchten Leberausstrichen nehmen die diploiden Zellkerne mit steigendem Lebensalter immer stärker ab. Die tetraploiden Leberzellkerne werden viel häufiger, und schließlich tritt noch eine Population oktoploider Leberzellkerne auf. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Fluoreszenzhistogrammen von LÖHR und HIMMELSBACH (1972). Die unterschiedlichen Meßbereiche wurden den Ploidieklassen zugeordnet.

2. ZYTOPHOTOMETRIE

Die Ergebnisse der Messungen sind in den Tabellen I bis VIII und Abbildungen 1 bis 6 zusammengefaßt, nach Färbemethode und Dosisgruppierung geordnet. Jede Tabelle enthält:

Bezeichnung der Färbung

Dosisgruppe

Lebensalter in Monaten

Serie

Tiernummer

Anzahl der gemessenen Kerne pro Präparat

arithmetischer Mittelwert der Fluoreszenzemission ($\bar{x}$)

Standardabweichung (S)

Standardabweichung des Mittelwertes ($S_{\bar{x}}$) pro Präparat.

a. Zytophotometrie nach Feulgen-Reaktion

Die Feulgen-Meßwerte, in Arbeitseinheiten (AE) angegeben, geben den relativen DNA-Gehalt der gemessenen Leberzellkerne wieder. Die errechneten mittleren Extinktionswerte mit Standardabweichungen der Mittelwerte sind in der Tabelle I (Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW) und Tabelle II (Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW) zusammengestellt. Die Mittelwerte der Kontrolltiere weisen keinen eindeutigen Unterschied gegenüber den Mittelwerten hormonbehandelter Tiere der entsprechenden Altersklasse auf.

Dies wird auch in der Abbildung 1 ersichtlich, wo die mittleren Extinktionswerte der verschiedenen Altersgruppen keine Differenzen zeigen. Die mittleren Extinktionswerte beziehen sich nunmehr auf die Einzelemissionen aller Tiere einer Alters- und Dosisgruppe.

Als Referenzsystem wurden insgesamt 1138 von Kupffersche Sternzellen und homologe Lymphozyten (pro Präparat 40 - 50) gewählt. Ihr mittlerer Extinktionswert betrug nach der Feulgen-Nucleal-Reaktion $5,7 \pm 1,0$ AE. Damit wird der relative DNA-Gehalt diploider Zellkerne fixiert (Abb. 1: gestrichelte Linie).

b. Zytophotometrie nach Fastgreen-FCF-Färbung

Mit dem Farbstoff Fastgreen FCF werden spezifisch basische Kernproteine (Histone) dargestellt. Nach Gabe von 25 mg HC pro 200 g KGW weisen die 4 Monate alten Tiere eine Emission von $9,5 \pm 1,2$ AE, die 12 Monate alten Tiere $11,1 \pm 1,3$ AE, die 24 Monate alten Tiere $11,7 \pm 1,3$ AE auf. Die Emissionswerte der Kontrolltiere der entsprechenden Altersgruppen betrugen $8,2 \pm 1,1$ AE, $10,9 \pm 1,0$ AE, $11,9 \pm 1,2$ AE (Tabellen III und IV sowie Abb. 2).

Die gestrichelte Linie in Abb. 2 zeigt den diploiden Wert nach Fastgreen-Färbung $9,2 \pm 1,2$ AE, ermittelt durch das Referenzsystem (1218 homologe Lymphozyten und von Kupffersche Sternzellen).

FEULGEN

Dosis	Alter	Tier Nr.	Serie	Anzahl d. Kerne	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
25 mg HC/200g Körpergewicht	24 Monate	1	A	122	5,49	0,66	0,06
		2	B	102	5,69	0,70	0,07
		10	C	130 50	6,54 6,56	1,01 1,13	0,09 0,16
		11	D	114 50	6,38 6,12	0,85 0,90	0,08 0,13
		Kontroll tier 7	A - D	103	5,62	0,69	0,06
		Kontroll tier 16	A - D	120 50	6,72 6,24	1,12 1,06	0,10 0,15
	12 Monate	3	A	104	5,42	0,68	0,07
		4	B	101	5,74	0,70	0,07
		12	C	100 52	6,22 5,73	0,96 1,09	0,10 0,15
		13	D	105 51	6,07 5,82	0,97 0,97	0,10 0,14
		Kontroll tier 8	A - D	116	5,62	0,67	0,06
		Kontroll tier 17	A - D	109 52	6,07 5,85	0,86 1,02	0,08 0,14
	4 Monate	5	A	114	5,44	0,62	0,06
		6	B	114	5,14	0,56	0,05
		14	C	102 52	5,67 5,35	0,95 1,06	0,09 0,15
		15	D	102 50	5,71 5,58	0,98 0,91	0,10 0,13
		Kontroll tier 9	A - D	106	5,32	0,59	0,06
		Kontroll tier 18	A - D	117 55	5,54 5,35	0,99 1,06	0,09 0,14

Tabelle I:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (S) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) der Fluoreszenzemissionen von Mäuseleberzellkernen nach Feulgen-Nuclear-Reaktion.

Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien A - D₃

AE in $2 \times 10^{-3} \mu\text{A/Skt}$ bei 570 nm.

Aufschlüsselung nach Altersklassen.

Dosis	Alter	Tier Nr.	Serie	Anzahl d. Kerne	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
5 mg HC/200g Körpergewicht	24 Monate	19	E	131 46	5,62 5,72	0,80 0,94	0,07 0,14
		27	F	120 50	5,73 5,84	0,90 1,10	0,08 0,14
		Kontroll tier 24	E - H	111 40	5,70 5,63	0,76 0,87	0,07 0,14
		Kontroll tier 32	E - H	118 40	5,83 5,50	0,80 0,85	0,07 0,13
	12 Monate	20	E	146 46	5,54 5,46	0,81 0,81	0,07 0,12
		21	F	125 31	5,41 5,58	0,68 0,85	0,06 0,15
		28	G	105 43	5,85 5,67	0,74 0,94	0,07 0,14
		29	H	135 42	5,70 5,74	0,77 0,91	0,07 0,14
		Kontroll tier 25	E - H	110 40	5,51 5,65	0,76 0,89	0,07 0,14
		Kontroll tier 33	E - H	128 45	5,91 5,76	0,79 0,93	0,07 0,14
	4 Monate	22	E	118 35	5,61 5,34	0,81 0,84	0,07 0,14
		23	F	110 40	5,35 5,30	0,76 0,82	0,07 0,13
		30	G	120 52	5,74 5,58	0,70 0,78	0,06 0,11
		31	H	103 45	5,83 5,62	0,71 0,86	0,07 0,13
		Kontroll tier 26	E - H	122 41	5,50 5,32	0,86 0,84	0,08 0,13
		Kontroll tier 34	E - H	116 40	5,78 5,68	0,83 0,80	0,08 0,13

Tabelle II:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (S) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) der Fluoreszenzemissionen von Mäuseleberzellkernen nach Feulgen-Nuclear-Reaktion.
Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien E - H $\cdot 10^{-3}$

AE in 2×10^{-3} μ A/Skt bei 570 nm.

Aufschlüsselung nach Altersklassen.

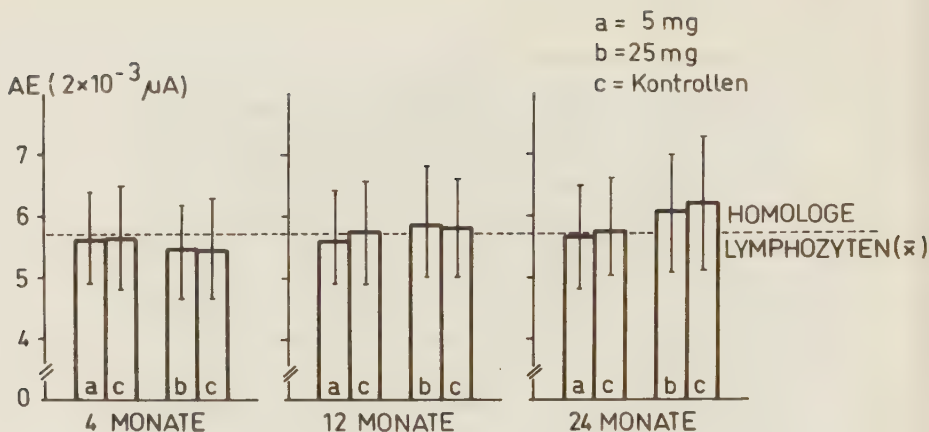


Abb. 1:

Sammelmitteiwerte der Fluoreszenzemissionen mit Standardabweichungen der Leberzellkerne von Mäusen aus drei Altersgruppen nach Feulgen-Nucleal-Reaktion.

AE in $2 \times 10^{-3} \mu A/Skt$ bei 570 nm.

Aufschlüsselung nach Altersklassen und Dosisgruppen.

a = 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW

b = 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW

c = Kontrollen

Durchbrochene Linie = Sammelmitteiwerte homologer Lymphozyten und von Kupfferscher Sternzellen (n = 1138)

Dosis	Alter	Tier Nr.	Serie	Anzahl d. Kerne	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
25 mg HC/200g Körpergewicht	24 Monate	1	A	139	13,67	1,30	0,11
		2	B	114	13,21	1,03	0,10
		10	C	127 65	10,53 9,48	1,05 1,24	0,09 0,15
		11	D	125 48	10,91 10,31	1,08 1,43	0,10 0,21
		Kontrolltier 7	A - D	110	13,66	1,27	0,12
		Kontrolltier 16	A - D	138 52	10,09 9,15	1,10 0,94	0,09 0,13
	12 Monate	3	A	94	13,13	1,34	0,14
		4	B	106	11,99	1,55	0,15
		12	C	165 58	9,59 9,78	1,02 1,09	0,08 0,14
		13	D	105 30	9,55 9,50	1,01 0,97	0,10 0,18
		Kontrolltier 8	A - D	100	12,47	1,41	0,14
		Kontrolltier 17	A - D	103 40	9,37 9,68	0,99 1,10	0,10 0,17
	4 Monate	5	A	109	9,86	1,19	0,11
		6	B	100	9,91	1,15	0,11
		14	C	111 57	9,13 8,67	1,06 1,20	0,10 0,16
		15	D	150 48	9,11 8,44	0,94 1,09	0,08 0,16
		Kontrolltier 9	A - D	102	8,52	1,46	0,14
		Kontrolltier 18	A - D	108 42	7,92 7,88	1,17 0,99	0,11 0,15

Tabelle III:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (S) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) der Fluoreszenzemissionen von Mäuseleberzellkernen nach Fastgreen-Färbung (FCF).

Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien A - D₃

AE in 2×10^{-3} μ A/Skt bei 630 nm.

Aufschlüsselung nach Altersklassen.

Dosis	Alter	Tier Nr.	Serie	Anzahl d. Kerne	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
5 mg HC/200g Körpergewicht		19	E	104 50	10,02 9,88	1,04 1,06	0,10 0,15
		27	F	114 48	10,25 9,79	1,06 1,07	0,10 0,15
		Kontroll tier 24	E - H	112 51	9,59 8,96	0,98 1,02	0,09 0,14
		Kontroll tier 32	E - H	120 37	9,98 9,95	1,16 1,10	0,11 0,18
	12 Monate	20	E	109 59	9,50 9,22	0,96 0,93	0,09 0,12
		21	F	107 40	9,65 9,28	0,95 1,06	0,09 0,17
		28	G	111 51	9,21 9,06	0,98 0,97	0,09 0,14
		29	H	173 51	9,46 9,41	0,96 0,94	0,07 0,13
		Kontroll tier 25	E - H	120 51	9,15 9,14	0,96 1,00	0,09 0,14
		Kontroll tier 33	E - H	146 42	9,27 8,93	0,93 0,89	0,08 0,14
	4 Monate	22	E	112 50	8,92 8,90	0,82 1,04	0,08 0,15
		23	F	109 50	9,28 8,92	1,03 1,07	0,10 0,15
		30	G	141 50	9,24 9,22	1,06 1,07	0,09 0,15
		31	H	108 51	9,50 9,08	1,03 1,02	0,10 0,14
		Kontroll tier 26	E - H	132 57	8,07 7,82	1,05 0,97	0,09 0,13
		Kontroll tier 34	E - H	131 40	8,75 8,90	1,07 1,03	0,09 0,16

Tabelle IV:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (S) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) der Fluoreszenzemissionen von Mäuseleberzellkernen nach Fastgreen-Färbung (FCF).

Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien E - H.

AE in 2×10^{-3} μ A/Skt bei 630 nm.

Aufschlüsselung nach Altersklassen.

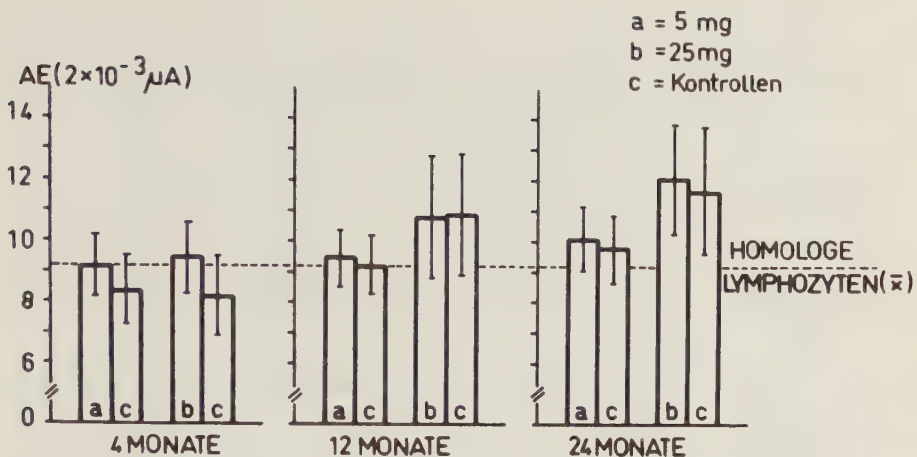


Abb. 2:

Sammelmitteiwerte mit Standardabweichungen der Fluoreszenz-emissionen der Leberzellkerne von Mäusen aus drei Altersgruppen nach Fastgreen-FCF-Färbung.

AE in $2 \times 10^{-3} \mu A/Skt$ bei 630 nm.

Aufschlüsselung nach Altersklassen und Dosisgruppen.

a = 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW

b = 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW

c = Kontrollen

Durchbrochene Linie: Sammelmitteiwerte homologer Lymphozyten und von Kupfferscher Sternzellen (n = 1218)

c. Zytophotometrie nach der Acridinorange-Färbung

Der basische Farbstoff Acridinorange bindet sich mit hochgeordneter doppelsträngiger DNA in einem Verhältnis $\text{DNA-PO}_4^{--} : \text{AO} = 6 : 1$, wobei pro drei Basenpaare ein AO-Molekül fixiert wird. Die errechneten mittleren Extinktionswerte mit Standardabweichungen und Standardabweichungen der Mittelwerte, nach Markierung mit dem basischen Farbstoff AO (pH 4,1, nach Acetylierung), geben ein relatives Maß für die sogenannten "freien" DNA-PO_4^{--} -Gruppen im Chromatin nativer Mäuseleberzellkerne. Die pH-Erniedrigung bringt eine Dissoziation des DNP-Komplexes und Blockierung der proteingebundenen Aminogruppen durch Acetylierung mit sich, so daß keine kompetitive elektrostatische Bindung dieser kationischen Gruppen mit den DNA-PO_4^{--} -Gruppen stattfinden kann. Eine Anfärbung anderer PO_4^{--} -Gruppen, z. B. RNA-PO_4^{--} -Gruppen, Carboxylgruppen der Nucleoproteine, Phosphatiden, Glycoproteiden und Polysacchariden, ist ausgeschlossen.

Die Ergebnisse nach AO-Färbung unter Hydrocortisonacetatapplikation und bei den Kontrolltieren sind aus den Tabellen V und VI sowie den Abbildungen 3 und 4 ersichtlich. Die Fluoreszenzemissionen wurden bei 530 nm in $2 \times 10^{-3} \mu\text{A AE/Skt}$ gemessen.

Die Tabellen V und VI geben die Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardabweichungen der Mittelwerte der Fluoreszenzemissionen von je 100 bis 180 diploiden Mäuseleberzellkernen pro Präparat wieder. Die Serien A - D (Dosisgruppe 25 mg HC pro 200 g KGW) sind in Tabelle V und die Serien E - H (Dosisgruppe 5 mg HC pro 200 g KGW) in der Tabelle VI aufgeführt. Alle Präparate sind nach Individualalter geordnet.

In den Abbildungen 3 und 4 sind die Sammelmittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzemissionen der jeweiligen Altersklassen in einem Koordinatensystem gegen das Alter aufgetragen.

Dosis	Alter	Tier Nr.	Serie	Anzahl d. Kerne	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
25mg HC/200g Körpergewicht	24 Monate	1	A	127	9,31	1,09	0,10
		2	B	105	9,18	0,87	0,09
		10	C	110	9,55	0,87	0,08
		11	D	112	9,35	0,76	0,07
		Kontroll tier 7	A-D	125	7,74	0,85	0,08
		Kontroll tier 16	A-D	107	7,67	0,99	0,10
	12 Monate	3	A	113	11,27	1,14	0,11
		4	B	128	11,40	1,12	0,10
		12	C	104	11,08	1,40	0,14
		13	D	101	10,63	1,06	0,11
		Kontroll tier 8	A-D	138	8,96	0,91	0,08
		Kontroll tier 17	A-D	141	9,10	1,10	0,09
	4 Monate	5	A	105	16,33	1,63	0,16
		6	B	114	15,87	1,29	0,12
		14	C	106	16,71	0,99	0,10
		15	D	100	16,44	1,10	0,11
		Kontroll tier 9	A-D	108	10,69	0,85	0,08
		Kontroll tier 18	A-D	120	10,22	1,22	0,11

Tabelle V:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (S) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) der Fluoreszenzemissionen von Mäuseleberzellkernen nach Acridinorange-Färbung (pH 4,1 nach Acetylierung).

Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien A - D₁₋₃

AE in 2×10^{-3} μ A/Skt bei 530 nm.

Dosis	Alter	Tier Nr.	Serie	Anzahl d. Kerne	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
5mg HC/200g Körpergewicht	24 Monate	19	E	102	11,86	1,09	0,11
		27	F	125	10,79	1,03	0,09
		Kontroll tier 24	E-H	127	11,22	1,20	0,11
		Kontroll tier 32	E-H	132	9,98	0,98	0,09
	12 Monate	20	E	103	13,31	1,16	0,11
		21	F	113	13,04	1,11	0,10
		28	G	100	11,91	0,84	0,08
		29	H	106	11,85	0,98	0,10
		Kontroll tier 25	E-H	116	12,46	1,09	0,10
		Kontroll tier 33	E-H	115	10,95	0,97	0,09
	4 Monate	22	E	104	17,81	0,98	0,10
		23	F	100	17,86	0,96	0,10
		30	G	127	16,62	1,04	0,09
		31	H	114	16,80	0,85	0,08
		Kontroll tier 26	E-H	101	14,99	1,08	0,10
		Kontroll tier 34	E-H	130	13,71	1,04	0,09

Tabelle VI:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (S) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) der Fluoreszenzemissionen von Mäuseleberzellkernen nach Acridinorange-Färbung (pH 4,1 nach Acetylierung).

Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien e - H₂

AE in 2×10^{-3} μ A/Skt bei 530 nm.



Abb. 3:

Graphische Darstellung der Sammelmittelwerte mit Standardabweichungen von den Fluoreszenzemissionen der Leberzellkerne von Mäusen aus drei Altersklassen nach Acridinorange-Färbung. AE in $2 \times 10^{-3} \mu A/Skt$ bei 530 nm.

Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien A - D.

Abszisse: Lebensalter in Monaten

Ordinate: Fluoreszenzemission in $0,02 \mu A$ pro angegebene Einheit

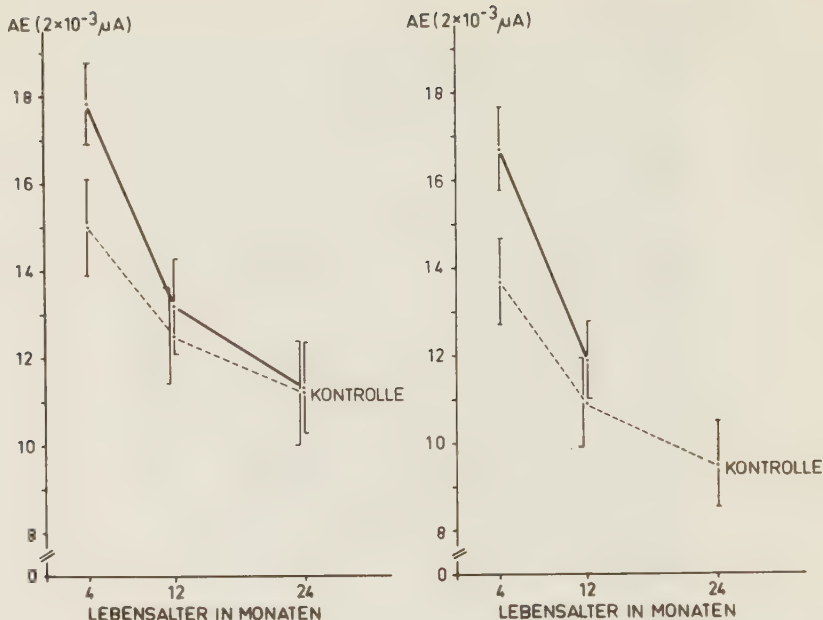


Abb. 4:

Graphische Darstellung der Sammelmittelwerte mit Standardabweichungen von den Fluoreszenzemissionen der Leberzellkerne von Mäusen aus drei Altersklassen nach Acridinorange-Färbung. AE in $2 \times 10^{-3} \mu A/Skt$ bei 530 nm. Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 mg KGW. Serien E - F und Serien G - H getrennt dargestellt (s. Text). Abszisse: Lebensalter in Monaten Ordinate: Fluoreszenzemission in $0,02 \mu A$ pro angegebene Einheit.

Aus dem Vergleich der Extinktions-Basiswerte unbehandelter Tiere geht hervor, daß die Fluoreszenzemissionen mit steigendem Individualalter abnehmen. Die auf der Interkalation des basischen Farbstoffmoleküls AO beruhende mittlere Fluoreszenzemission beträgt bei den 4 Monate alten Tieren der Serien A - D $10,5 \pm 1,0$ AE. Bei den 12 Monate alten Tieren ist ein Rückgang der mittleren Fluoreszenzemissionen auf $9,0 \pm 1,0$ AE, bei den 24 Monate alten Tieren bis auf $7,7 \pm 0,9$ AE festzustellen. Die Gesamtabnahme der Emissionswerte beträgt zwischen dem 4. und 24. Lebensmonat 27 %.

In den einzelnen Färbeserien ist das Fluoreszenzmissionsniveau der Kontrolltiere einer Altersklasse unterschiedlich hoch. Diese Differenz kann vernachlässigt werden, da die Arbeitseinheiten relative Werte sind. In Abbildung 4 werden die Meßergebnisse der Serien E und F sowie der Serien G und H getrennt graphisch dargestellt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Extinktionen ist durch den notwendig gewordenen Austausch des Xenon-Höchstdruckbrenners (x BO 150 W, Osram, W.-Berlin).

In den Abbildungen 3 und 4 ist ebenfalls der Abfall der Farbstoffbindungskapazität des DNP für AO bei den nicht mit Hormon behandelten Tieren festgehalten. Durch die einmalige Applikation von 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW wird ein starker Anstieg der Fluoreszenzemissionen in diploiden Zellkernen beobachtet. Dieser Anstieg hat sein Maximum bei den 4 Monate alten Mäusen der Serie A - D mit Werten von $16,3 \pm 1,3$ AE gegenüber $10,5 \pm 1,0$ AE der unbehandelten Kontrolltiere. Das entspricht einem Anstieg von etwa 36 %.

Bei den 12 und 24 Monate alten Tieren dagegen wird eine solche Differenz der Extinktionen zwischen unbehandelten und Hormon-stimulierten Tieren nicht mehr eindeutig sichtbar. Hier liegen die Werte der 12 Monate alten Tiere bei $11,1 \pm 1,2$ AE (Hormon-stimuliert) und $9,0 \pm 1,0$ AE. Entsprechend verhalten sich die mittleren Emissionswerte in der höchsten Altersgruppe mit $9,4 \pm 0,9$ AE (Hormon-stimuliert) und $7,7 \pm 0,9$ AE.

Die niedrigere Dosierung des Hormons mit 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW bewirkt bei den jungen Tieren mit 4 Lebensmonaten eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenzemission diploider Leberzellkerne (um etwa 15 %), die deutlich geringer ist als die in der hohen Dosisgruppe (36 %). Hier liegen die Emissionsmittelwerte der Kontrolltiere bei $15,0 \pm 1,0$ AE, diejenigen der Hormon-behandelten Mäuse bei $17,5 \pm 1,0$ AE. In den Altersgruppen 12 Monate und 24 Monate ist durch 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW kein eindeutiger Anstieg der Fluoreszenzemissionen zu erzielen.

Dosisabhängig ergibt sich also eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzemissionen, wobei die Werte der Tiere aus den Serien A - D (Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW) höher liegen als die Werte der Serien E - H (Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW).

e. Zytophotometrie nach Phenanthrenchinon-Färbung

Die Färbemethode nach MAGUN und KELLY (1969) erlaubt eine quantitative Aussage über den Arginingehalt von Lösungen und Geweben. Mit dem Farbstoff Phenanthrenchinon, in alkalischer Äthanol-lösung, werden spezifisch die Guanidinogruppen von polypeptidgebundenen Argininresiduen markiert. In einer modifizierten Sakaguchi-Reaktion bilden sich als Kondensationsprodukt zwischen dem Farbstoff und den Arginin-Guanidinogruppen (2-Amino-1H-phenanthro-(9,10-d)-imidazol) relativ stabile Komplexe. Die dargestellten Guanidinogruppen dürften in erster Linie Bausteine der basischen nukleären Histone sein.

Die Fixierungsdauer der Präparate betrug nie länger als 24 Stunden bei $+ 4^{\circ}$ C im Kühlschrank, um den Fixationseffekt des neutral gepufferten Formalins zu vermeiden (LÖHR und HEIMER 1972). Die Emissionswerte sind in Arbeitseinheiten (AE, 2×10^{-3} μ A) angegeben ($\lambda = 530$ nm). Es zeigen sich nach PQ-Markierung den

Dosis	Alter	Tier Nr.	Serie	Anzahl d. Kerne	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
25mg HC/200g Körpergewicht	24 Monate	1	A'	247	9,08	1,16	0,07
		2	B'	156	9,00	1,02	0,08
		10	C'	119	9,61	0,89	0,08
		11	D'	129	9,78	0,94	0,08
		Kontroll tier 7	A'-D'	184	7,53	0,89	0,07
		Kontroll tier 16	A'-D'	119	7,61	1,20	0,11
	12 Monate	3	A'	141	12,79	1,81	0,15
		4	B'	160	11,66	1,26	0,10
		12	C'	113	12,10	0,95	0,09
		13	D'	117	11,32	1,11	0,10
		Kontroll tier 8	A'-D'	-			
		Kontroll tier 17	A'-D'	124	9,71	1,29	0,12
	4 Monate	5	A'	134	16,65	1,79	0,15
		6	B'	112	17,19	1,60	0,15
		14	C'	100	16,23	0,95	0,10
		15	D'	103	16,36	1,07	0,11
		Kontroll tier 9	A'-D'	217	10,01	0,87	0,06
		Kontroll tier 18	A'-D'	135	10,08	0,99	0,08

Tabelle VII:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (S) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) der Fluoreszenzemissionen von Mäuseleberzellkernen nach Phenanthrenchinon-Färbung.
Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien A - D₃

AE in 2×10^{-3} μ A/Skt bei 490 nm.

Aufschlüsselung nach Altersklassen.

Dosis	Alter	Tier Nr.	Serie	Anzahl d. Kerne	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$
5mg HC/200g Körpergewicht	24 Monate	19	E'	182	8,73	0,87	0,06
		27	F'	115	9,58	0,96	0,09
		Kontroll tier 24	E'-H'	187	7,60	0,91	0,07
		Kontroll tier 32	E'-H'	117	8,69	0,94	0,09
	12 Monate	20	E'	113	9,96	0,93	0,09
		21	F'	107	10,52	1,06	0,10
		28	G'	109	10,67	0,98	0,09
		29	H'	106	9,74	0,82	0,08
		Kontroll tier 25	E'-H'	181	8,70	1,04	0,08
		Kontroll tier 33	E'-H'	134	9,13	0,96	0,08
	4 Monate	22	E'	138	12,72	1,13	0,99
		23	F'	132	12,86	1,33	0,12
		30	G'	102	13,48	0,96	0,10
		31	H'	109	13,46	1,13	0,11
		Kontroll tier 26	E'-H'	110	9,97	0,90	0,09
		Kontroll tier 34	E'-H'	123	10,33	1,04	0,09

Tabelle VIII:

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (S) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($S_{\bar{x}}$) der Fluoreszenzemissionen von Mäuseleberzellkernen nach Phenanthrenchinon-Färbung.

Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien E - H₃

AE in 2×10^{-3} μ A/Skt bei 490 nm.

Aufschlüsselung nach Altersklassen.

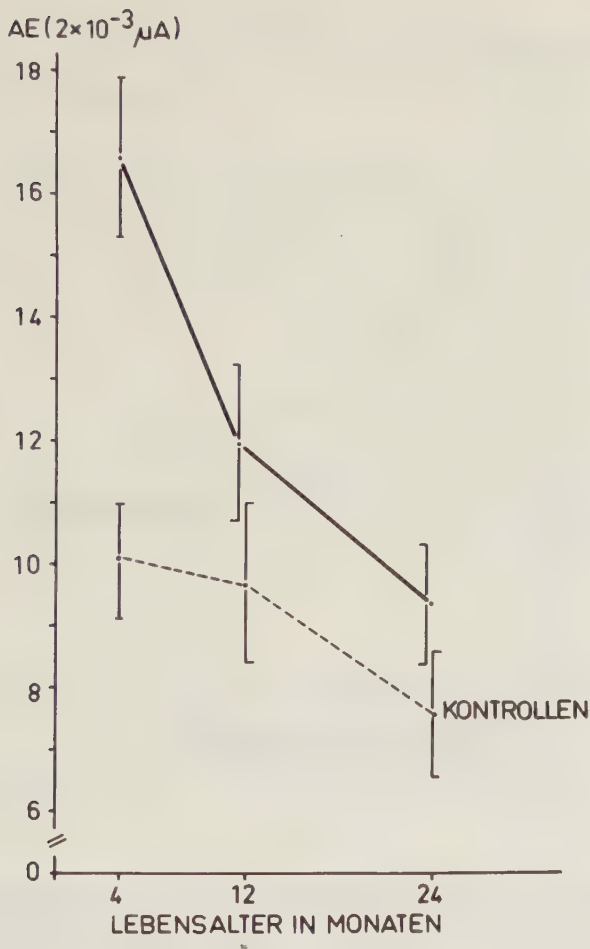


Abb. 5:

Graphische Darstellung der Sammelmittelwerte mit Standardabweichungen von den Fluoreszenzemissionen der Leberzellkerne von Mäusen aus drei Altersklassen nach Phenanthrenchinon-Färbung.

AE in $2 \times 10^{-3} \mu A/Skt$ bei 490 nm.

Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien A - D.

Abszisse: Lebensalter in Monaten

Ordinate: Fluoreszenzemission in $0,02 \mu A$ pro angegebene Einheit

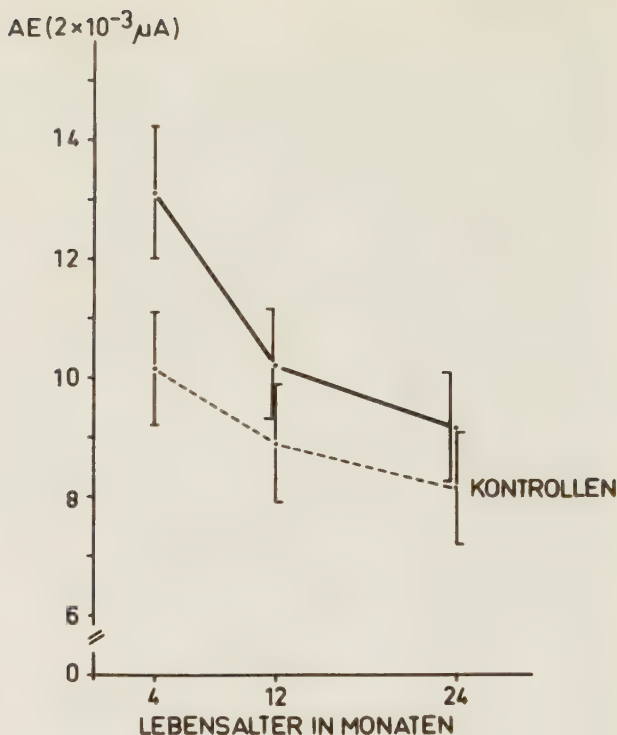


Abb. 6:

Graphische Darstellung der Sammelmittelwerte mit Standardabweichungen von den Fluoreszenzemissionen der Leberzellkerne von Mäusen aus drei Altersklassen nach Phenanthrenchinon-Färbung.

AE in $2 \times 10^{-3} \mu A/\text{Skt}$ bei 490 nm.

Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW.

Serien E - H.

Abszisse: Lebensalter in Monaten

Ordinate: Fluoreszenzemission in $0,02 \mu A$ pro angegebene Einheit.

Acridinorange-Werten analoge Befunde. Die Ergebnisse der Messungen sind in den Tabellen VII und VIII sowie in den Abbildungen 5 und 6 zusammengefaßt.

Es ergeben sich in den Leberzellkernpräparaten junger und alter Tiere, die nicht unter dem Hormonstimulus standen, Unterschiede der Mittelwerte der Fluoreszenzemissionen des DNP-Komplexes. Die 4-Monate-Tiere weisen in den Serien A - D eine mittlere Extinktion von $10,1 \pm 0,9$ AE, die Leberzellkerne der 12-Monate-Tiere von $9,7 \pm 1,3$ AE und die der 24-Monate-Tiere von $7,6 \pm 1,1$ AE auf.

In den Serien E - H weisen die 4-Monate-Tiere eine Fluoreszenzemission von $10,2 \pm 1,0$ AE, die 12-Monate-Tiere von $8,9 \pm 1,0$ AE und die 24-Monate-Tiere von $8,2 \pm 0,9$ AE auf. Die Fluoreszenzemission nimmt somit mit steigendem Individualalter (von 4 Monate bis 24 Monate) um 20 bis 25 % ab.

Das Maximum der Fluoreszenzemissionen wird bei den vier hormonbehandelten 4-Monate-Tieren aus den Serien A - D (Abb. 5) mit einem Mittelwert von $16,6 \pm 1,4$ AE in den diploiden Leberzellkernen erreicht. Die Werte für die 12-Monate-Tiere liegen bei einem Mittel von $12,0 \pm 1,3$ AE, die der 24 Monate alten Tiere bei $9,4 \pm 1,0$ AE.

Auch in den Serien E - H (Abb. 6) zeigt sich ein deutlicher Unterschied der Mittelwerte in den Leberzellpräparaten junger und alter Mäuse. Das Maximum der Fluoreszenzemissionen wird bei den vier Tieren der Altersklasse 4 Monate mit einem Mittelwert von $13,1 \pm 1,1$ AE in den diploiden Zellkernen erreicht. Die Werte für die 12 Monate alten Tiere liegen bei $10,2 \pm 1,0$ AE, die der 24 Monate alten Tiere bei $9,2 \pm 0,9$ AE.

Es läßt sich somit ein Anstieg der Farbstoffbindungskapazität nativer Mäuseleberzellkerne von hormonbehandelten Tieren gegenüber unbehandelten Kontrolltieren um nahezu 40 % in der

Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW nachweisen. Ein entsprechender Anstieg der Farbstoffbindungskapazität um etwa 20 % wurde bei den 12- und 24-Monate-Tieren beobachtet.

Gegenüber den mittleren Extinktionswerten der unbehandelten Kontrolltiere ist in der Dosisgruppe 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW ein Anstieg der Fluoreszenzemission der 4-Monate-Tiere um 22 %, der 12-Monate-Tiere um 14 % und der 24-Monate-Tiere um 11 % zu verzeichnen.

Die Ergebnisse zeigen, daß verschiedene Extinktionswerte unter differierender Hydrocortisonacetatdosierung ermittelt werden können. Bei einer Senkung der Hormonapplikation von 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW auf 5 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW läßt sich eine Abnahme der Fluoreszenzemission der stimulierten DNP-Komplexe um etwa 50 % nachweisen.

D . D I S K U S S I O N

In der gerontologischen Forschung sind die Interphasekerne der Leberzelle ein beliebtes Objekt zur Untersuchung der Alterns- und Alterungsvorgänge nukleärer DNP-Komplexe (v. HAHN 1966; SANDRITTER et al. 1967; DENKHAUS und HEIMER 1970; LÖHR 1972). Das strukturell in der DNA gespeicherte genetische Potential enthält Informationen für Funktion, Wachstum, Differenzierung, Altern und Alterung der Zelle.

Zu den Kontrollmechanismen von Genaktivität bzw. der Realisierung genetischer Information in höheren Organismen gehören auch Hormonwirkungen (KÜHNNAU 1971). In der vorliegenden Arbeit wurde durch adäquate exogene Stimulation mit dem Hormon Hydrocortisonacetat die Antwortbereitschaft des Genoms junger und alter Individuen geprüft. Das Hydrocortisonacetat wurde deswegen gewählt, weil ein Eingreifen dieses Hormons auf Transkriptions- und Translationsebene heute als erwiesen gilt (JERVELL 1963; DAHMUS und BONNER 1965; BEATO et al. 1968; KARLSON und SEKERIS 1973).

Nach zahlreichen Experimenten mit Hydrocortison (SEKERIS und LANG 1965; MONDER und WALKER 1967; SLUYSER 1967; BEATO et al. 1968) kann man annehmen, daß dieses Hormon die Wirksamkeit der Histone als Genrepressoren und Strukturstabilisatoren verändert und damit die Genaktivität im Sinne einer spezifischen Stimulierung der Transkription beeinflussen kann. Vermutlich besteht eine Wechselwirkung zwischen Hormon als Effektor und basischem Kernprotein als Repressor in Übereinstimmung mit dem Modell von JACOB und MONOD (HARBERS und SANDRITTER 1973).

In-vitro-Versuche lassen vermuten, daß die Corticosteroide mit den Histonen der Fraktionen F_3 und F_{2a} über ihre 11b-Hydroxy- oder 11-Ketogruppen reagieren (SLUYSER 1967; SUNAGA und KOIDE 1967). Beweise für eine metabolische Transformation des Hydrocortisons im Zellkern liegen nicht vor (BEATO et al. 1969; HANOUNE und FEIGELSON 1969; MURTHY et al. 1970).

Bevor das Hormon in den Zellkern gelangt, wird es an zytoplasmatische Makromoleküle reaktiver Gewebe gebunden (FIALA 1966; NAORA und NAORA 1967; GARDNER und TOMKINS 1969; MOREY und LITWACK 1969; MUNCK und WIRA 1970; BAXTER und TOMKINS 1970, 1971). Diese Makromoleküle sind weitgehend rein dargestellt worden. Eine A-Fraktion erwies sich als spezifischer Glucocorticoidrezeptor (BEATO et al. 1970; BEATO et al. 1972). Eine B-Fraktion ist dem Transcortin sehr ähnlich. Nur der "A-Binder" sorgt für die Akkumulation des Cortisols und seinen Transport in den Zellkern.

Ob das nukleäre Rezeptorprotein auch an der Regulation der Transkription beteiligt ist, indem es als Rezeptorprotein-Hormon-Komplex auf den zu fordernden Repressor einwirkt und ihn inaktiviert, ist noch ungeklärt (KARLSON und SEKERIS 1973). Eine Bindung zwischen Rezeptorprotein-Hormon-Komplex und DNA ist bis heute nicht erwiesen (BAXTER et al. 1972).

Die Wirkung des Cortisols/Hydrocortisons auf die RNA-Biosynthese konnte in zahlreichen Versuchen demonstriert werden. Mit biochemischen Methoden, wie Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen in hochmolekulare RNA, konnte man die RNA-Syntheserateerhöhung direkt messen, entweder in vivo (WICKS et al. 1961; AGARWAL und HANOUNE 1969; YU und FEIGELSON 1969, 1970) und dank methodischer Entwicklung auch in geeigneten in-vitro-Systemen (SCHMID et al. 1967). Die Syntheserate sowohl für uridinreiche RNA (m-RNA) wie für guaninreiche RNA (t-RNA) ist nach Hydrocortisonstimulierung erhöht (YU und FEIGELSON 1969).

Die erhöhte RNA-Biosynthese bzw. die erhöhte Matrizenaktivität des Chromatis setzen eine Aktivierung des Enzyms "DNA-abhängige RNA-Polymerase" voraus (SEKERIS und LANG 1965; LUKACS und SEKERIS 1967; BEATO et al. 1970; YU und FEIGELSON 1971). Man hat die Möglichkeit diskutiert, daß die DNA-abhängige RNA-Polymerase spezifische Repressoren, die vielleicht Histone sein könnten, inaktiviert und daß es dadurch zu einer Vermehrung aktiver Stellen an der DNA kommen konnte (SEKERIS und

LANG 1965). Das Hormon wirkt wahrscheinlich nicht auf das Enzymprotein selbst ein. Die erhöhte Syntheserate der RNA-Polymerase durch Cortisol wird entweder durch vermehrte Freigabe der DNA-Matrize für die Biosynthese (DAHMUS und BONNER 1965) oder durch erhöhte Transkriptionsgeschwindigkeit bedingt (KARLSON und SEKERIS 1973).

Die biochemische Konsequenz dieser Vorgänge durch Hydrocortisonstimulierung auf der Transkriptions- und Translationsebene wäre eine gesteigerte Proteinbiosynthese (JERVELL 1963; AMARAL et al. 1969). Es wird eine Reihe Enzyme des Aminosäurestoffwechsels und der Gluconeogenese induziert, darunter die Tyrosintransaminase (TOMKINS et al. 1965; WICKS 1968, 1969), Tryptophanpyrrolase (JERVELL 1963; SHORE et al. 1971), Tryptophantransaminase (DAHMUS und BONNER 1965; GARDNER und TOMKINS 1969), Tryptophanoxygenase (YU und FEIGELSON 1969), Threonindehydrase, Phosphoglyceraldehyd-dehydrogenase.

Die Vorgänge der Transkription genetischer Information lassen sich am besten am "Operon"-Modell von JACOB und MONOD (1961) illustrieren. Diese Autoren postulieren einen sogenannten Repressor, der zunächst im aktivierten Zustand die Transkription blockiert und somit eine Enzyminduktion hemmt. Wird der Repressor inaktiviert, z. B. durch einen sogenannten Induktor bzw. Effektor, dann findet eine Enzyminduktion statt. Dieser Mechanismus ist bei Bakterien gut erforscht. Inwieweit jedoch dieses Modell auch auf höhere Organismen übertragen werden kann, ist umstritten (HARBERS 1969).

Die Entdeckung hemmender Effekte der sogenannten argininreichen Histone auf die m-RNA- und Proteinbiosynthese erlaubt möglicherweise die Vorstellung, daß diese basischen Kernproteine eine Art Repressorfunktion ausüben (HUANG und BONNER 1962; ALFREY et al. 1963). Kombiniert man die bekannte Funktion der Histone mit dem Modell von JACOB und MONOD, dann führt eine permanente Repression bestimmter Gene durch eine vermutlich

irreversible Repressor- bzw. Histon-Strukturgenbindung zu der im Alter auftretenden verminderten Fähigkeit, RNA und Protein zu synthetisieren.

Man könnte sich vorstellen, daß die reaktiven, kationischen Gruppen (Guanidinogruppen) der argininreichen Histone die im Zellkern vorhandenen sterisch "freien" DNA-PO_4^{--} -Gruppen mit zunehmendem Alter zunehmend blockieren. Dies würde in Übereinstimmung mit der Theorie von VERZAR (1962) eine Stabilisierung der heteropolaren Bindungen innerhalb des DNP-Komplexes bedeuten.

Da die Protein- und Enzybiosynthese der Zelle im Alter reduziert sind, könnte man auch einen Mangel an spezifischen Trägerproteinen diskutieren, was zu einem gestörten Regelmechanismus der genetischen Informationsübertragung führen könnte.

Infolge der geschilderten Alternsprozesse der Zelle müßte die Dissoziation des hormonstimulierten DNP-Komplexes in gealtertem Gewebe erschwert sein. Damit könnte die Bestimmung der sterisch "freien" DNA-PO_4^{--} -Gruppen eine Aussage über den aktuellen Repressionsgrad des DNP-Komplexes (RIGLER 1966; LÖHR 1972) erlauben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die "freien" DNA-PO_4^{--} -Gruppen quantitativ mit der Acridinorange-Färbung und die Guanidinogruppen nukleärer Argininresiduen mit der Phenanthrenchinon-Färbung bestimmt, um die Antwortbereitschaft des Genoms junger und alter Mäuse auf Hydrocortisonstimulierung zu prüfen.

Die AO-Färbung beruht auf einer Diffusion des basischen Farbstoffes Acridinorange (3,6-bis-dimethyl-amino-acridinum-chlorid) durch die Zellmembran, wobei Temperatur, Farbstoffkonzentration, Porengröße und Fixation die Reaktion beeinflussen können. Die von RIGLER (1966) beschriebenen Färbebedingungen wurden deshalb genauestens eingehalten. Acridinorange bindet sich stöchiometrisch und spezifisch an Nukleinsäuren. Die

Komplexbildung ist abhängig von der Anzahl "freier" reaktiver Gruppen der Nukleinsäuren und von ihrer Sekundärstruktur. Nukleinsäuren mit Doppelhelixstruktur (DNA) binden Acridinorange in einer monomeren Form mit einem Emissionsmaximum bei 530 nm.

Die Reaktionen zwischen Farbstoff und DNA werden durch "fremde" kationische Gruppen der Nucleoproteine vermutlich kompetitiv gehemmt. Erst eine Blockierung oder Elimination dieser Gruppen würden eine quantitative Reaktion zwischen dem Farbstoff und den DNA-PO_4^{--} -Gruppen gestatten (RIGLER 1966; DENKHAUS und HEIMER 1970). Dies wird erreicht durch Erniedrigung der sauren anionischen Gruppen (wie Carboxylgruppen, Polysulfate, Phosphatide, Glycoproteine, anorganische Anionen). Eine verstärkte Protein-Nukleinsäurebindung sollte die Folge sein.

In der Versuchsanordnung wurden die repressorisch wirkenden Aminogruppen der Proteine (vermutlich Guanidinogruppen) mit Hilfe von Acetessigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert und somit "geblockt". Eine komplette Freisetzung von Phosphatgruppen in DNP ist die Folge. Dadurch wird zwar die Struktur des DNP partiell gestört, die Helixstruktur jedoch erhalten. Die AO-Reaktion kann daher unter Berücksichtigung des bisher bekannten DNP-Modelles als ein empfindlicher und spezifischer Indikator für Änderungen der Matrizenaktivität der DNA gelten (RIGLER 1966).

In unserer Arbeit war eine deutliche Abnahme der im Zellkern vorhandenen AO-bindenden "aktiven" Gruppen bzw. sterisch "freien" Phosphatgruppen mit zunehmendem Alter festzustellen. Dies könnte bedeuten, daß die Freisetzung der Phosphatgruppen bzw. die Überführung von genetisch inaktivem in genetisch aktives Chromatin im Alter erschwert ist.

Der Anstieg der AO-Bindungskapazität als Maß für die "Freisetzung" der DNA-PO_4^{--} -Gruppen wird auch in den Untersuchung von DARZYNKIEWICZ et al. (1969), RIGLER et al. (1969), RIGLER und

KILLANDER (1969) sowie KILLANDER und RIGLER (1969) demonstriert. An menschlichen Lympho- und Leukozyten sowie Mäusefibroblasten und anderen Zellsystemen, die mit Phytohaemagglutininen (PHA) stimuliert wurden, konnte ein signifikanter Anstieg des pro DNA-Einheit gebundenen AO-Farbstoffes bei gleichzeitiger Steigerung der de-novo-Biosynthese nukleärer RNA-Fraktionen beobachtet werden.

LÖHR et al. (1974 a, b, c) sowie MÜLLER et al. (1974) gelang es, nach der Applikation von Hydrocortison oder Trijodthyronin eine Analyse der RNA-Fraktionen von Interphase-Rattenleberzellkernen vorzunehmen. In ihren Versuchen zeigte sich nach Aufzeichnung des Polysomenprofiles eine signifikant erhöhte Biosynthese von m-RNA. Daraus ist zu schließen, daß dem Anstieg der Hormon-induzierten m-RNA-de-novo-Biosynthese eine Freisetzung von DNA-PO_4^{--} -Gruppen parallel läuft. In unserer Arbeit konnten wir eine deutliche Differenz der AO-Bindungskapazität des DNP-Komplexes junger und alter Hydrocortisonacetat-behandelter Mäuse feststellen. Wir konnten bei den behandelten älteren Tieren (12 und 24 Monate) in der niedrigeren Dosisgruppe (5 mg HC/200 g KGW) eine Zunahme der Fluoreszenzemission von weniger als 10 % gegenüber den Kontrolltieren nachweisen. Die HC-behandelten Jungtiere (4 Monate) dieser Dosisgruppe zeigten einen Anstieg der Farbstoffbindungskapazität von etwa 15 % gegenüber den Kontrolltieren.

In der höheren Dosisgruppe (25 mg HC/200 g KGW) zeigten die beiden älteren Tiergruppen eine Zunahme der Farbstoffbindungskapazität von etwa 17 % gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren. Die Jungtiere dagegen zeigten eine Zunahme der Fluoreszenzemission von 36 % gegenüber den Kontrolltieren. Unter Berücksichtigung der oben zitierten Autoren stehen somit weniger freie DNA-PO_4^{--} -Gruppen im Alter zur Verfügung.

Die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei den hormonbehandelten Tieren zeigt, daß das Genom alter Mäuse sich nur sehr schwer und nur mit unphysiologischen Dosen von Hydrocortison-

acetat stimulieren läßt. Es scheint eine zunehmende Reprimierung genetischen Materials vorzuliegen. Die Abnahmerate der Emission ähnelt einer negativen Exponentialfunktion, die bis zu einem Grenzwert geht. So reagiert der DNP-Komplex der 12 Monate alten Tiere mit einer Extinktion, die nicht mehr von der Extinktion der 24 Monate alten Tiere zu unterscheiden ist.

Die Abnahmerate der Farbstoffbindungskapazität im Alter spricht dafür, daß die DNA-PO_4^{--} -Gruppen, vermutlich durch Stabilisierung der DNP-Komplexbindungen, zunehmend blockiert werden. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen somit die Hypothese von v. HAHN (1963 a, b, 1964/65 a, b, 1965, 1966 a, b, 1971), der eine verminderte Reagibilität des Leberzellkern-DNP-Komplexes alter Tiere postuliert.

Unsere Ergebnisse nach der Feulgen-Nucleal-Reaktion bestätigen einerseits die bekannte und erwartende Konstanz des mittleren DNA-Gehaltes aller Mäuseleberzellkerne im Verlauf des physiologischen Alterns, andererseits die Annahme, daß die Erhöhung der Farbstoffbindungskapazität des DNP bei Acridinorange nicht auf Änderungen des DNA-Gehaltes zurückgeführt werden kann. Sowohl die mit Hydrocortisonacetat unterschiedlicher Dosierung behandelten Mäuse verschiedener Altersklassen als auch die Kontrolltiere zeigten bei unseren Untersuchungen keine Veränderungen des mittleren DNA-Gehaltes nach der Feulgen-Nucleal-Reaktion. Man kann somit annehmen, daß das Hydrocortisonacetat, auch bei unphysiologisch hoher Dosierung, keine signifikante Änderung des mittleren DNA-Gehaltes der Leberzellkerne bei den von uns untersuchten Mäusen bewirkt.

Die geringgradigen Schwankungen der Fluoreszenzemissionen können durch die Präparationsmethoden beeinflusst sein, da es sich bei den untersuchten Präparaten nicht um isoliertes Nucleoproteid oder DNA-Präparationen handelt, sondern um morphologisch intakte Zellkerne. Dabei spielt der durch die Alkoholfixierung bedingte "Proportionalitätsfaktor" eine Rolle (SANDRITTER et al. 1965).

Die Befunde nach der Phenanthrenchinon-Färbung entsprechen den Ergebnissen nach der Acridinorange-Färbung. Es läßt sich in unserer Arbeit ein deutlicher Anstieg der Farbstoffbindungs-kapazität nativer Mäuseleberzellkerne von hormonbehandelten Tieren gegenüber unbehandelten Kontrolltieren um nahezu 40 % in der Dosisgruppe 25 mg Hydrocortisonacetat pro 200 g KGW nachweisen. Bei den beiden älteren Tiergruppen war der Anstieg auf die Hälfte reduziert (20 %). In der niedrigeren Dosisgruppe war ein Anstieg der Fluoreszenzemission der Jungtiere um 22 %, der beiden älteren Tiergruppen um 11 bis 14 % zu verzeichnen.

Vermutlich stehen im Alter weniger mit dem Farbstoff Phenanthrenchinon erfaßbare Guanidinogruppen der Argininresiduen zur Verfügung. Auch hier dürfte die Stabilisierung der DNA-Nucleohistonbindungen im Alter bedeutsam sein. Ob es sich hier um eine DNA-abhängige Blockierung nukleärer Argininresiduen handelt, kann in dieser Arbeit jedoch nicht bewiesen werden; es könnte sich auch um eine interfraktionelle Transformation der Histone handeln (v. HAHN 1971).

Die von uns im Alter nachgewiesene Färbbarkeitszunahme für Fastgreen FCF steht im Widerspruch zu früheren biochemischen Ergebnissen, die eine Konstanz des DNA-Histon-Mengenverhältnisses vermuten lassen (HARBERS 1969; NOESKE 1968). Eine Färbbarkeitszunahme für FCF im Alter wurde bereits von LÖHR und HIMMELSBACH (1972) beobachtet.

Zusammenfassend bedeuten die hier vorgetragenen Ergebnisse durch den Nachweis einer altersabhängigen Abnahme der Farbstoffbindungskapazität des DNP für die Farbstoffe Acridinorange und Phenanthrenchinon eine Bestätigung der v.-HAHNschen physiologischen Alterungs-Hypothese, die den altersspezifischen irreversiblen Heteropyknoseprozeß auf eine physikochemische Stabilisierung der elektrostatischen Bindungen zwischen den Chromatinbausteinen zurückführt. Sie bedeuten gleichzeitig durch den Nachweis, daß bei alten Tieren die Farbstoffbindungskapazität durch einen hormonellen Stimulus nicht mehr erhöht werden kann, eine Bestätigung für den im Alter vermuteten "relativen Verlust" an genetischer Information.

E . Z U S A M M E N F A S S U N G

Der Leberzell-DNP-Komplex 4, 12 und 24 Monate alter Mäuse wurde durch intramuskuläre Applikation von 5 mg bzw. 25 mg Hydrocortisonacetat hormonell stimuliert. Es wurde der Einfluß des Hormons auf die Farbstoffbindungskapazitäten von diploiden Interphase-Leberzellkernen für Acridinorange, Phenanthrenchinon in Abhängigkeit vom Lebensalter geprüft. Simultan wurden die Feulgen-Nucleal-Reaktion und die Fastgreen-FCF-Markierung durchgeführt.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Altersgruppen in der Farbstoffbindungskapazität für Acridinorange und Phenanthrenchinon sowohl bei den hormonbehandelten als auch bei den Kontrolltieren, die auf Änderungen des Repressionsgrades des DNP-Komplexes als Ausdruck einer altersabhängigen Stabilisierung der Funktionsstrukturen der Zelle hindeuten könnten.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. AGARWAL, M.K., J. HANOUNE, F.L. YU, I.B. WEINSTEIN and P. FEIGELSON (1969):
Studies on the effect of cortisone on rat liver transfer ribonucleic acid.
Biochemistry 8, 4806 - 4812
2. ALLFREY, V.G., V.C. LITTAU and A.E. MIRSKY (1963):
On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus.
Proc. nat. Acad. Sci. Wash. 49, 414 - 421
3. AMARAL, L., L.G. MORIBER and M. HIMES (1969):
The effect of cortisone on the volume and total protein content of mouse liver nuclei.
J. Cell biol. 42, 835 - 837
4. BAXTER, J.D., and G.M. TOMKINS (1970):
The relationship between glucocorticoid binding and tyrosine aminotransferase induction in hepatoma tissue culture cells.
Proc. nat. Acad. Sci. 65, 709 - 715
5. BAXTER, J.D., and G.M. TOMKINS (1971 a):
Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells.
Proc. nat. Acad. Sci. 68, 932 - 937
6. BAXTER, J.D., and G.M. TOMKINS (1971 b):
Glucocorticoid hormone receptors.
In: Advances in the Biosciences 7.
Pergamon-Press-Vieweg
7. BAXTER, J.D., G.G. ROUSSEAU, M.C. BENSON, J. GARCEA and G.M. TOMKINS (1972):
Role of DNA and specific cytoplasmic receptors in glucocorticoid action.
Proc. nat. Acad. Sci. Wash. 69, 1892 - 1896
8. BEATO, M., J. HOMOKI, I. LUKACS and C.E. SEKERIS (1968):
Increased template activity for RNA synthesis of rat liver nuclei incubated with cortisol "in vitro".
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1099 - 1104
9. BEATO, M., J. HOMOKI und C.E. SEKERIS (1968):
Über den Angriffspunkt des Cortisols im Zellkern.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1239 - 1240
10. BEATO, M., J. HOMOKI and C.E. SEKERIS (1969):
On the mechanism of hormone action. XII. Uptake of 1,2 ³H cortisol by isolated rat liver nuclei.
Exptl. Cell Res. 55, 107 - 117

11. BEATO, M., D. BIESEWIG, W. BRAENDLE and C.E. SEKERIS (1969):
On the mechanism of hormone action. XV. Subcellular distribution
and binding of (1,2-³H)cortisol in rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 192, 494 - 507
12. BEATO, M., W. BRAENDLE, D. BIESEWIG and C.E. SEKERIS (1970):
On the mechanism of hormone action. XVI. Transfer of (1,2-³H)
cortisol from the cytoplasm to the nucleus of rat-liver cells.
Biochim. Biophys. Acta 208, 125 - 136
13. BEATO, M., W. SCHMID, W. BRAENDLE, D. BIESEWIG and C.E. SEKERIS
(1971):
Binding of ³H-cortisol to macromolecular components of rat liver
cells and its relation to the mechanism of action of cortico-
steroids.
In: Advances in the Biosciences 7.
Pergamon Press-Vieweg
14. BEATO, M., W. SCHMID and C.E. SEKERIS (1972):
Two cortisol binding proteins from rat liver cytosol.
Biochim. Biophys. Acta 263, 764 - 774
15. BENEKE, G., W. SCHMITT und K. PAULINI (1971):
Altersabhängige Veränderungen des Zellkernes in Beziehung zur
Zelleistung.
In: Molekulare und zelluläre Aspekte des Alterns. Ed. D. PLATT
und H.G. LASCH
Stuttgart - New York, 109 - 123
16. BÖHM, N., and E. SPRENGER (1968):
Fluorescence cytophotometry a valuable method for the quanti-
tative determination of nuclear Feulgen-DNA.
Histochemie 16, 100 - 118
17. BÖHM, N., E. SPRENGER, G. SCHLÜTER und W. SANDRITTER (1968):
Proportionalitätsfehler bei der Feulgen-Hydrolyse.
Histochemie 15, 194 - 203
18. BUCK, M.D., and P. SCHAUDER (1970):
In vivo stimulation of ¹⁴C-amino acid incorporation into non-
histone proteins in rat liver chromatin induced by insulin and
cortisol.
Biochim. Biophys. Acta 224, 644 - 646
19. BURDON, R.H., and C.A. PEARCE (1971):
Enzymic modification of chromosomal macromolecules. III. The
effect of adenine nucleotides on histone modification in chroma-
tin and possible influence of steroid hormones.
Biochim. Biophys. Acta 246, 561 - 571
20. COMFORT, A. (1968):
Physiology, homeostasis and aging.
Gerontologia 14, 224 - 234 (Basel)

21. COMFORT, A. (1970):
Models of aging: mammals.
In: Perspectives in experimental gerontology. Ed. N.W. Schock
Springfield, 245 - 253
22. DAHMUS, M.E., and J. BONNER (1965):
Increased template activity of liver chromatin, a result of
hydrocortisone administration.
Proc. nat. Acad. Sci. 54, 1370 - 1375
23. DARZYNKIEWICZ, Z., L. BOLUND and N.R. RINGERTS (1969):
Actinomycin binding of normal and phytohaemagglutinin stimu-
lated lymphocytes.
Exptl. Cell Res. 55, 120 - 132
24. DENKHAUS, W., und D. HEIMER (1970):
Mikrofluorometrische Bestimmung der "freien DNS-PO₄-Gruppen"
im Chromatin nativer Leberzellkerne von jungen und alten Meer-
schweinchen.
Gerontologia 16, 1 - 13
25. DENKHAUS, W., G. KIEFER und P. MEUTER (1969):
Untersuchungen über altersabhängige Veränderungen der Säure-
labilität des Nucleoproteids.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 3, 171 - 180
26. ENESCO, H.E. (1967):
A cytophotometric analysis of DNA content of rat nuclei in aging.
J. Geront. 22, 445 - 448
27. FIALA, E.S., and G. LITWACK (1966):
Binding of a (¹⁴C)hydrocortisone metabolite in liver supernatant.
Biochim. Biophys. Acta 124, 260 - 266
28. GARDNER, R.S., and G.M. TOMKINS (1969):
Steroid hormone binding to a macromolecule from hepatoma tissue
culture cells.
J. biol. chem. 244, 4761 - 4767
29. FRENSTER, J.H. (1965 a):
A model of specific derepression within interphase chromatin.
Nature (Lond.) 206, 1269 -.
30. FRENSTER, J.H. (1965 b):
Nuclear polyanions as derepressors of synthesis of ribonucleic
acid.
Nature (Lond.) 206, 680 - 683
31. FRENSTER, J.H. (1965 c):
Mechanisms of repression and derepression within interphase
chromatin;
In: Dane the chromosome: structural and functional aspects.
Williams and Wilkins, Baltimore, 78 - 101

32. HAHN, H.P. von (1963 a):
Age-dependent thermal denaturation and viscosity of crude and purified desoxyribonucleic acid prepared from bovine thymus.
Gerontologia (Basel) 8, 123 - 131
33. HAHN, H.P. von (1963 b):
The role of desoxyribonucleic acid (DNA) in the aging process.
Gerontologia (Basel) 8, 168 - 178
34. HAHN, H.P. von (1964/65 a):
Analysis of histones from thymus of young and old bovines by gel filtration.
Gerontologia (Basel) 10, 107 - 116
35. HAHN, H.P. von (1964/65 b):
Age-related alterations in the structure of DNA. II. The role of histones.
Gerontologia (Basel) 10, 174 - 182
36. HAHN, H.P. von (1965):
Stabilisation of DNA-structures by histones against thermal denaturation.
Experientia 21, 90 - 91
37. HAHN, H.P. von (1966 a):
Distribution of DNA and RNA in the brain during the life span of the albino rat.
Gerontologia (Basel) 12, 18 - 29
38. HAHN, H.P. von (1966 b):
A model of regulatory aging of the cell at the gene level.
J. Geront. 21, 291 - 294
39. HAHN, H.P. von (1971):
Altern von Nucleoprotein.
In: D. PLATT und H.G. LASCH: Molekulare und zelluläre Aspekte des Alterns.
Schattauer, Stuttgart, 125 - 127
40. HAHN, H.P. von, J. MILLER and G.L. EICHORN (1969):
Age-related alterations in the structure of nucleoprotein.
Gerontologia (Basel) 15, 293 - 301
41. HAHN, H.P. von, and F. VERZAR (1963):
Age-dependent thermal denaturation of DNA from bovine thymus.
Gerontologia (Basel) 7, 105 - 108
42. HANOUNE, J., and P. FEIGELSON (1969):
The absence of cortisone effect on the synthesis of specific histones and ribosomal protein subunits in liver.
Biochim. Biophys. Res. Comm. Vol 34, No 2, 215 -.
43. HANOUNE, J., and P. FEIGELSON (1970):
Turnover of protein and RNA of liver ribosomal components in normal and cortisol treated rats.
Biochim. Biophys. Acta 199, 214 - 223

44. HARBERS, E. (1969):
Nucleinsäuren. Biochemie und Funktionen.
Thieme, Stuttgart
45. HARBERS, E., und W. SANDRITTER (1968):
Gesteigerte Heterochromatisierung als pathogenetisches Prinzip.
Dtsch. med. Wschr. 93, 269 - 271
46. HARBERS, E., und W. SANDRITTER (1973):
Aufbau und Funktion des Chromatins.
Klin. Wschr. 51, 631 - 643
47. HEIMER, D. (1972):
Quantitative Bestimmung der "freien" DNS-PO₄-Gruppen in menschlichen Leberzellkernen in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Mainz, Univ., Med. Fak., Diss.
48. HUANG, R.Ch.C., and J. BONNER (1962):
Histone, a supressor of chromosomal RNA-synthesis.
Proc. nat. Acad. Sci. 48, 1216 - 1222
49. JERVELL, K.F. (1963):
Early effects of glucocorticoids on ribonucleic acid and protein metabolism in rat liver.
Acta endocrin. Vol. 44, suppl. 88, 3 - 36
50. KARLSON, P., und C.E. SEKERIS (1973):
Wirkungsmechanismus der Steroidhormone.
Dtsch. med. Wschr. 98, 831 - 835
51. KENNEY, F.T., and W.L. ALBRITTON (1965):
Repression of enzyme synthesis at the translation level and its hormonal control.
Proc. nat. Acad. Sci. 54, 1693 - 1698
52. KILLANDER, D., and R. RIGLER (1969):
Activation of deoxyribonucleoprotein in human leucocytes stimulated by phytohaemagglutinin. I. Kinetic of the binding of acridine orange to deoxyribonucleoprotein.
Exp. Cell Res. 54, 163 - 170
53. KNIPPERS, R. (1971):
Molekulare Genetik.
Thieme, Stuttgart
54. KÜHNAU, J. (1971):
Physiologie und Biochemie der endokrinen Regulationen und Korrelationen.
In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Vol.VIII/1
Springer, Berlin - Heidelberg - New York
55. LANG, N., und C.E. SEKERIS (1964):
Einfluß von Cortisol auf den Ribonucleinsäure- und Proteinstoffwechsel in Rattenleber.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 339, 238 - 248

56. LÖHR, J. (1972):
ACTH-induzierter Strukturwandel des Nucleoproteidkomplexes von Leberzellkernen junger und alter Ratten.
Gerontologia (Basel) 18, 113 - 121
57. LÖHR, J., und D. HEIMER (1972):
Zytophotometrische Untersuchungen über altersabhängige Strukturveränderungen am Nucleoproteinkomplex von Leberzellkernen.
Gerontologia (Basel) 18, 122 - 130
58. LÖHR, J., und K.H. HIMMELSBACH (1973):
Fluoreszenzphotometrische Untersuchungen zum Alterungsprozeß an Mäuseleberzellkernen.
Z. Geront. 6, H. 2, 131 - 143
59. LÖHR, J., W.E.G. MÜLLER and R. ZAHN (1974 a):
The influence of hydrocortisone-acetate of the course of the phenanthrenequinone reaction during the RNA synthesis in the interphase nuclei from rat liver cells.
10th Int. Congr. Int. Acad. Path. Post-Cogr. Symp. "DNA and Pathology". Freiburg, 22.9.1974
60. LÖHR, J., und W.E.G. MÜLLER (1974 b):
Zur Kinetik der Acridinorange-Reaktion bei der Cortison-induzierten RNA-Biosynthese in der Rattenleber.
XVII. Symp. Ges. Histochem. Bozen/Italien, 5.10.1974
61. LÖHR, J., und W.E.G. MÜLLER (1974 c):
Zum Einfluß des Trijodthyronin auf die RNA-Biosynthese in der Rattenleber.
Herbsttg. Dtsch. Ges. Path., Mainz, 12.10.1974
62. LUKACS, I., and C.E. SEKERIS (1967):
On the mechanism of hormone action. IX. Stimulation of RNA-polymerase activity of rat-liver nuclei by cortisol in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 134, 85 - 90
63. MAGUN, B.E., and J.W. KELLY (1969):
A new fluorescent method with phenanthrenequinone for the histochemical demonstrations of arginine residues in tissues.
J. Histochem. cytochem. vol. 17, No 12, 821 - 927
64. MAKMAN, M.H., B. DVORKIN and A. WHITE (1966):
Alterations on protein and nucleic acid metabolism of thymocytes produced by adrenal steroids in vitro.
J. biol. chem. 241, 1646 - 1648
65. MAKMAN, M.H., B. DVORKIN and A. WHITE (1971):
Evidence for induction by cortisol in vitro of a protein inhibitor of transport and phosphorylation processes in rat thymocytes.
Proc. nat. Acad. Sci. 68, 1269 - 1273

66. MARTIN, D.W., and G.M. TOMKINS (1970):
The appearance and disappearance of the posttranscriptional repressor of tyrosine aminotransferase synthesis during the HTC cell cycle.
Proc. nat. Acad. Sci. 65, 1064 - 1068
67. MEDVEDEV, Zh.A. (1964):
The nucleic acids in development and aging.
In: Gerontological research. Ed. B.L. STREHLER
New York - London, 181 - 206
68. MEDVEDEV, Zh.A. (1966):
Protein biosynthesis and problems of heredity development and aging.
Edinburgh - London
69. MONDER, C., and M.C. WALKER (1970):
Interactions between corticosteroids and histones.
Biochemistry 9, 2489 - 2497
70. MOREY, K.S., and G. LITWACK (1969):
Isolation and properties of cortisol metabolite binding proteins of rat liver cytosol.
Biochemistry 8, 4813 - 4821
71. MÜLLER, D. (1966):
Erfahrungen mit der Feulgenfärbung für quantitative cytochemische DNS-Untersuchungen.
Histochemie 7, 96 - 102
72. MÜLLER, W.E.G., J. LÖHR und R. ZAHN (1974):
Biochemical and cytophotometrical determination of the "free DNA-PO₄-groups" in interphase nuclei from rat liver during induction of RNA synthesis by triiodothyronine.
10th Int. Congr. Int. Acad. Path. Post-Congr. Symp. "DNA and Pathology", Freiburg, 22.9.1974
73. MUNCK, A., und T. BRINCK-JOHNSSEN (1968):
Specific and nonspecific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells in vitro.
J. biol. chem. 243, 5556 - 5565
74. MUNCK, A., and Ch. WIRA (1971):
Glucocorticoid receptors in rat thymus cells.
In: Advances in the Biosciences 7.
Pergamon Press-Vieweg, 301 - 326
75. MURTHY, L.D., D.S. PRADHAN and A. SREENIVASAN (1970):
Effects of hydrocortisone upon metabolism of histones in rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 199, 500 - 510
76. NAORA, H., and H. NAORA (1967):
Interaction of DNA with cytoplasmic particles. I. Formation of a cytoplasmic particle-DNA complex.
Biochim. Biophys. Acta 134, 277 - 288

77. NOESKE, K. (1968):
Die Zusammensetzung der Zellkernproteine und ihre Beziehung zum DNS-Gehalt im Verlauf der normalen Myelo- und Erythropoese beim Menschen. Habil.-Schrift, Gießen
78. PAULINI, K., G. BENEKE und U. PAUKNER (1971):
Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Akt. Geront. 1, 455 - 459
79. PIETRO, -, - LAMBORG and F.T. KENNEY (1968):
Regulatory mechanism for protein synthesis in mammalian cells.
Acad. Press, New York - London
80. RIGLER, R. jr. (1966):
Microfluorometric characterisation of intracellular nucleic acids and nucleoproteins by acridinorange.
Acta physiol. scand. 67, suppl. 267, 1 - 123
81. RIGLER, R., D. KILLANDER, L. BOLUND and N.R. RINGERTZ (1969):
Activation of desoxyribonucleoprotein in human leucocytes stimulated by phytohemagglutinin. II. Structural changes of deoxyribonucleoprotein and synthesis of RNA.
Exp. Cell Res. 54, 171 - 180
82. RIGLER, R. jr., D. KILLANDER, L. BOLUND and N.R. RINGERTZ (1969):
Cytochemical characterization of desoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei.
Exptl. Res. 55, 215 - 224
83. RIMBERG, D. von, A. von LOUD and J. WIENER (1968):
Cortisone-induced alterations in mitochondrial function and structure.
J. cell biol. 37, 63 - 79
84. RINGERTZ, N.R., and L. BOLUND (1969):
"Activation" of hen erythrocyte desoxyribonucleoprotein.
Exptl. Cell Res. 55, 205 - 214
85. SANDRITTER, W., K. JOBST, L. RAKOW und K. BOSSELMANN (1965):
Zur Kinetik der Feulgen-Reaktion bei verlängerter Hydrolysezeit.
Histochemie 4, 420 - 437
86. SANDRITTER, W., G. KIEFER, G. SCHLÜTER und W. MOORE (1967):
Eine cytophotometrische Methode zur Objektivierung der Morphologie von Zellkernen. Ein Beitrag zum Problem von Eu- und Heterochromatin.
Histochemie 10, 341 - 352
87. SCHAUDER, P., and M.D. BUCK (1971):
In vitro stimulation of (¹⁴C)amino acid incorporation into protein of isolated rat liver nuclei induced by cortisol pretreatment.
Biochim. Biophys. Acta 240, 151 - 153

88. SCHMID, W., D. GALLWITZ and C.E. SEKERIS (1967):
On the mechanism of hormone action. VIII. Further studies on the effect of cortisol on isolated rat-liver nuclei.
Biochim. Biophys. Acta 134, 80 - 84
89. SEKERIS, C.E., und N. LANG (1965):
Bindung von (³H)Cortison an Histonen aus Rattenleber.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 340, 92 - 94
90. SHELTON, K.R., and V.G. ALLFREY (1970):
Selective synthesis of a nuclear acidic protein in liver cells stimulated by cortisol.
Nature (Lond.) 228, 132 - 134
91. SHORE, M.L., R.P. FELTEN, A. LAMANNA and E.P.M. SHEPPARD (1971):
Relative rates of tryptophan pyrrolase degradation following the administration of hydrocortisone and tryptophan to intact and adrenalectomized rats.
Biochim. Biophys. Acta 252, 117 - 124
92. SCHULZ, G. (1972):
Die Bedeutung von cyclischem AMP bei Hormonwirkungen.
Der Internist 13, 159 - 166
93. SINEX, M. (1966):
Genetic mechanisms of aging.
J. Geront. 21, 340 - 346
94. SLUYSER, M. (1967):
Interaction between hormones, histones and desoxyribonucleic acids.
In: Regulation of nucleic acid and protein biosynthesis.
Ed. von KONINGSBERGER und BOSCH
Elsevier publ. Comp., Amsterdam - London - New York
95. SLUYSER, M. (1969):
Interaction of steroid hormones with histones in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 182, 235 - 244
96. SUNAGA, K., and S.S. KOIDE (1967):
Factors influencing the interaction of steroids with calf thymus histones.
Arch. biochem. biophys. 122, 670 - 673
97. TOMKINS, G.M., L.D. GARREN, R.R. HOWELL and B. PETERKOWSKY (1965)
The regulation of enzyme synthesis by steroid hormones. The role of translation.
Z. cell Comp. Physiol. 66, 137 - 152
98. TSAI, Y.H., and L.S. HNILICA (1971):
Interactions of histones with corticosteroid hormones.
Biochim. Biophys. Acta 238, 277 - 287

99. VERZAR, F. (1962):
Biologie des Alterns.
Schweiz. med. Wschr. 92, 1449 -.
100. WICKS, W.D., D.L. GREENMAN and F.T. KENNEY (1965):
Stimulation of ribonucleic acid synthesis by steroid hormones.
J. biol. chem. 240, 4414 - 4419
101. WICKS, W.D. (1968):
Induction of tyrosine- α -ketoglutarate transaminase in fetal rat liver.
J. biol. chem. 243, 900 - 906
102. WICKS, W.D. (1969):
Induction of hepatic enzymes by adenosine-3',5'-monophosphate.
Fed. proc. 28, 730 -.
103. YU, Fu-li, and P. FEIGELSON (1969):
The sequential stimulation of uracil-rich and guanine-rich RNA species during cortisone induction of hepatic enzymes.
Biochem. biophys. res. commun. 35, 499 - 504
104. YU, Fu-li, and P. FEIGELSON (1970):
A comparative study of RNA synthesis in rat hepatic nuclei and mitochondria under the influence of cortisone.
Biochim. Biophys. Acta 213, 134 - 141
105. YU, Fu-li, and P. FEIGELSON (1971):
Cortisone stimulation of nuclear RNA-polymerase.
Proc. nat. Acad. Sci. 68, 2177 - 2180
106. ZS-NAGY, -, H.P. von HAHN and F. VERZAR (1969):
Age-related alteration in the cell nuclei and the DNA content of rat tail tendon.
Gerontologia (Basel) 15, 258 - 264

L e b e n s l a u f

Als Tochter des norwegischen Dipl.-Ing. Arne Michelsen und seiner Ehefrau Alice, geb. Hansen, wurde ich am 18. Februar 1946 in Oslo geboren.

Nach Absolvierung der Volksschulzeit in Oslo besuchte ich das Gymnasium Oslo Kathedralschule, wo ich im Mai 1964 mein naturwissenschaftlich-mathematisches Abitur ablegte. Das Sommersemester 1965 begann ich mit dem Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, wo ich im Frühling 1966 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Sommersemester 1968 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im Wintersemester 1971 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

Am 1. September 1972 heiratete ich Dr. med. Friedrich-Karl Völker aus Hannover.

Als Medizinalassistent arbeitete ich auf dem Gebiet der Inneren Medizin, der Chirurgie und der Pathologie. Seit dem 1. Oktober 1973 bin ich als Assistentsärztin in der Abteilung für Anaesthesiologie der Medizinischen Hochschule Hannover beschäftigt.

Herrn Professor Dr. med. H. BREDT danke ich für die Erlaubnis, diese Arbeit durchführen zu dürfen.

Herrn Professor Dr. med. J. LÖHR möchte ich besonders für die hilfreiche Unterstützung und die vielen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Übernahme des Korreferates herzlich danken.

Herrn Dipl.-Mathematiker MAU vom Institut für Medizinische Statistik sei an dieser Stelle für sein freundliches Bemühen gedankt.

Druckerei und Buchbinderei der Tierärztlichen Hochschule Hannover
3 Hannover, Bischofsholer Damm 15